سلول‌های بنیادی جنینی: مفاهیم و پتانسیل‌ها

حسین بهاروند .Ph.D☆♦، سعید کاظمی آشتیانی .Ph.D☆

☆ پژوهشکده رویان، گروه سلول‌های بنیادی

♦ آدرس مکاتبه : تهران صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه سلول‌های بنیادی

پست الکترونیک: Email: Baharvand50@yahoo.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۴/۹/۱، پذیرش مقاله: ۸۴/۹/۲۱

سلول‌های بنیادی جنینی اغلب از توده سلولی داخلی بلاستوسیست مشتق شده و دارای خصوصیت خودنوزایی (self-renewal) و توان تمایز به انواع سلول‌ها (pluripotent) هستند، به طوری که می‌توانند مشتقات سه لایه زاینده جنینی را بسازند. در نتیجه این سلول‌ها ابزار ارزشمندی در مطالعات زیست‌شناسی تکوینی، طب پیوند، توسعه داروسازی، ناهنجاری‌شناسی و مطالعه عملکرد ژنها هستند. این مقاله به بیان ساده مفاهیم مطالعه سلول‌های بنیادی و کاربردهای بالقوه آنها می‌پردازد.

کلیدواژگان: سلول‌های بنیادی جنینی، تمایز، پیوند

فصلنامه پزشکی یاخته، سال هفتم، پاییز ۸۴، شماره ۲۷، صفحات ۱۹۳-۱۷۸

مقدمه

سلول‌های بنیادی (stem cells) دو ویژگی اساسی یعنی توانایی تقسیم و تولید سلول‌هایی با خواص یکسان (خود نوزایی: self-renewal) و ایجاد انواع سلول‌های تمایز یافته، دارند (برای مرور ر.ش. ۱). براساس توان تمایزی و برگشت پذیری آن‌ها، سلول‌ها را می‌توان به انواع ذیل تقسیم نمود (۲):

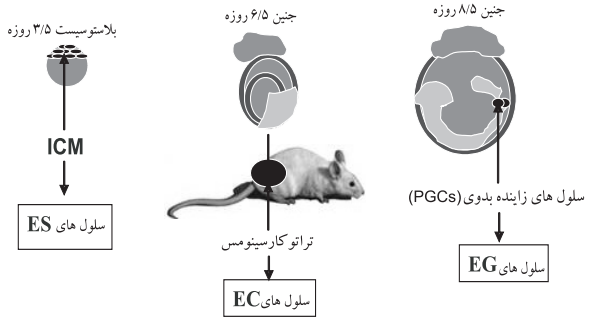
۱) همه توان (totipotent) :این سلول‌ها می‌توانند همه سلول‌ها اعم از سلول‌های فرد و سلول‌های برون‌جنینی (جفت) را بسازند مانند بلاستومرهای یک جنین دوسلولی که هر سلول آن می‌تواند یک فرد کامل را بسازد.

۲) پرتوان (pluripotent) : سلول‌هایی هستند که می‌توانند غالب یا همه سلول‌های فرد را بسازند. مثلا سلول‌های بنیادی جنینی تحت شرایط خاص می‌توانند یک فرد را بسازند، ولی قادر به ایجاد سلول‌های برون جنینی (جفت) نیستند. سلول‌هایی که از گنادهای جنینی (fetus) به دست می‌آیند و به آنها سلول‌های زاینده جنینی (Embryonic Germ cells: EG) گفته می‌شود (۳) نیز جزو این دسته هستند (شکل ۱). سلول‌های تمایز نیافته کارسینومای جنینی (Embryonal Carcinoma Cells; EC) مشتق از تراتوکارسینومس‌ها نیز پرتوان هستند (۴). تراتوکارسینومس‌ها، تومورهای تمایز یافته خوش‌خیم هستند که دارای جمعیت‌های تمایز نیافته زیادی هستند. مطالعات قبلی، رخداد تراتوکارسینوما به صورت خودبه‌خود را نشان داده است. این سلول‌ها قابلیت تمایز در محیط آزمایشگاهی و یا به صورت تشکیل تراتوکارسینوما را دارند. تک‌تک این سلول‌ها قادر به تشکیل کلونی هستند و با تمایز می‌توانند مشتقات سه لایه زاینده جنینی (اکتودرم، مزودرم و اندودرم) را به وجود آورند.

۳) چند توان (multipotent): تعداد محدودتری از انواع سلول را ایجاد می کنند (مانند سلول‌های بنیادی واقع در بافتهای بزرگسالان).

به طور کلی سلول‌های بنیادی دارای دو منشاء جنینی (embryonic) و بزرگسالان (adult) هستند. سلول‌های بنیادی جنینی از توده سلولی داخلی (inner cell mass: ICM) جنین در مرحله بلاستوسیست به دست می‌آیند (شکل ۱). دسته دیگر، سلول‌های‌بنیادی بزرگسالان هستند که در بسیاری از بافت‌های تخصص یافته بدن از جمله مغز، مغز استخوان، کبد، پوست، لوله گوارش، قرنیه و شبکیه چشم و حتی پالپ عاج دندان یافت می‌شوند (۱). در بزرگسالان در هنگام جراحت و حتی در غیاب آن، به طور مداوم این سلول‌ها فعال هستند. قبلا دانشمندان فکر می کردند که سلول‌های بنیادی بزرگسالان، تنها سلول‌های همان بافت را ایجاد می کنند، اما امروزه معتقدند پلاستیسیته این سلول‌ها بیش از آن است و این سلول‌ها می‌توانند انواع دیگری از سلول‌ها را بسازند. برای مثال سلول‌های بنیادی‌بزرگسالان مشتق از مغز استخوان، علاوه بر آن‌که می‌توانند سلول‌های خونی و ایمنی را بسازند، قادرند به صورت transdifferentiation و یا تمایز مستقیم، انواع دیگری از سلول‌ها نظیر سلول‌های ماهیچه اسکلتی، میکروگلیا و آستروگلیا در مغز و هپاتوسیتهای کبدی را بسازند (۵، ۶، ۷). براساس این مشاهدات پیشنهاد شده که ممکن است این سلول‌ها در طب پیوند قابل کاربرد باشند. اما دانشمندان دیگر در این مورد شک دارند و نشان داده‌اند که این سلول‌های بنیادی با سلول‌های سوماتیک در هم ادغام می‌شوند. گذشته ازاین تکرارپذیری تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان به بافت‌های غیرخونی کم دیده شده است. بنابراین به این سوال که آیا سلول‌های بنیادی بزرگسالان سلول‌های پرتوان حقیقی هستند و قادر به تکثیر نامحدود در محیط کشت هستند، هنوز پاسخ مشخصی داده نشده است. سلول‌های بنیادی و به خصوص سلول‌های بنیادی جنینی در مطالعات زیست‌شناسی تکوینی، طب پیوند، توسعه داروسازی و

ناهنجاری‌شناسی و تولید موشهای ترانس ژن و knockout اهمیت دارند. در اینجا به بیان نحوه تولید و کاربرد بالقوه سلول‌های بنیادی جنینی پرداخته می‌شود.



شکل ۱: مقایسه منشاء سلول‌های پرتوان سلول‌های بنیادی جنینی (ES) ، سلول‌های زاینده جنینی (EG) و سلول‌های کارسینومای جنینی (EC)
(مشاهده نمونه رنگی تصویر در انتهای مقالات)

سلول‌های بنیادی جنینی

سلول‌های بنیادی جنینی (ES) همراه با منشاءشان تعریف می‌شوند. این سلول‌ها از مرحله بلاستوسیست جنین به‌دست می‌آید. بلاستوسیست مرحله‌ای از تکوین پیش از لانه گزینی در پستانداران است که معمولا چهار تا پنج روز بعد از لقاح ایجاد می‌شود. در این مرحله جنین ۲۰۰-۱۰۰ سلول دارد و به صورت کره‌ای توخالی است. این کره متشکل از یک لایه سلولی برونی (تروفواکتودرم) است که به طور معمول پس از لانه‌گزینی در رحم، بخشی از جفت را می‌سازد. همچنین این کره دارای مجتمعی از سلول‌ها (حدود ۳۰-۲۰ سلول) در داخل کره به نام توده سلولی داخلی است.

روش‌های کشت سلول‌های بنیادی جنینی موشی که از توده سلولی داخلی بلاستوسیست به دست می‌آیند (شکل ۲)، حدود ۲۰ سال پیش گزارش شده‌اند (۸، ۹) و تاکنون تغییرات بسیار اندکی داشته‌اند. برای اولین بار تولید سلول‌های بنیادی جنینی انسانی در سال ۱۹۹۸ توسط تامسون و همکارانش گزارش شد (۱۰). علاوه بر این مطالعه سلول‌های کارسینومای جنینی موشی و انسانی به تولید و رشد سلول‌های بنیادی جنینی کمک نموده است. تاکنون تنها از سه گونه از پستانداران سلول‌های بنیادی جنینی با توان خود نوسازی و کشت‌های طولانی مدت به دست آمده است که عبارتند از موش، میمون، انسان (۱۴-۱۱). در موش بازدهی تولید سلول‌های بنیادی جنینی، تحت تاثیر نژاد ژنتیکی موش آزمایشگاهی، شرایط کشت و عواملی است که بر موش‌های ماده آبستن اثر می‌گذارد. تاکنون از نژادهای محدودی، سلول‌های بنیادی جنینی به دست‌آمده است (۱۵). رده‌های سلولی پرتوان مشتق از جنین موش، مدل مناسبی برای تحقیق پیرامون تمایز سلولی مهره‌داران است و سیستم مهمی را برای تغییرات ژنتیکی توسط فن‌آوری gene targeting فراهم می‌کند. به دلیل این کاربردهای سودمند، کوشش‌های فراوانی برای تولید سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های زاینده جنینی گونه‌های دیگر صورت گرفته است. علاوه بر این تاکنون از گونه‌های دیگری نیز سلول‌های بنیادی جنینی تهیه شده است که از آن جمله می‌توان به موارد Medakafish (۱۶)، گورخرماهی (۱۷)، جوجه (۱۸، ۱۹)، خرگوش (۲۰، ۲۱)، رت (۲۲)، هامستر (۲۳)، Mink (۲۴)، خوک (۲۵)، گاو (۲۶، ۲۷، ۲۸) و گوسفند (۲۹) اشاره نمود.

تولید رده‌های سلولی پرتوان، از مهره‌دارانی غیر از موش، اثر عمیقی بر مطالعات مراحل اولیه تکوین نظیر دودمان سلولی متعهد شده (cell lineage commitment) و نشانه گذاری ژنتیکی (genomic imprinting) و به خصوص تغییر ژنتیکی (genetic modification) و انتقال هسته در گونه‌های اهلی داشته است. اما تاکنون تولید فرد کامل از سلول‌های بنیادی جنینی سایر گونه‌ها به غیر از موش گزارش نشده است.

کلیات تولید سلول‌های بنیادی جنینی

تولید سلول‌های بنیادی جنینی از موش یا انسان، فرآیندی چند مرحله‌ای است که به طور شاخص شامل مراحل ذیل است (شکل ۲).

I) توده سلولی داخلی بلاستوسیست پیش از لانه‌گزینی از تروفواکتودرم اطراف آن جدا می‌شود. به طور کلی جداسازی بلاستوسیست به دو روش ذیل صورت می‌گیرد. هر دو روش در تولید سلول‌های بنیادی جنینی انسانی و موشی کاربرد دارد (۱۵، ۳۰).

الف) مکانیکی: پس از کشت بلاستوسیست، جنین به کف ظرف متصل می‌شود و سپس سلول‌های تروفواکتودرمی در سطح شروع به رشد می‌کنند ولی سلول‌های ICM به سمت بالا تکثیر می‌یابند و بعد از چند روز (۵-۳ روز) برآمدگی گنبدی شکلی درست می‌کنند. در این هنگام با کمک یک پیپت می‌توان به راحتی ICM را از تروفواکتودرم جدا کرد. البته گاهی نیز ICM همراه با تعدادی از سلول‌های تروفواکتودرم جدا می‌شود.

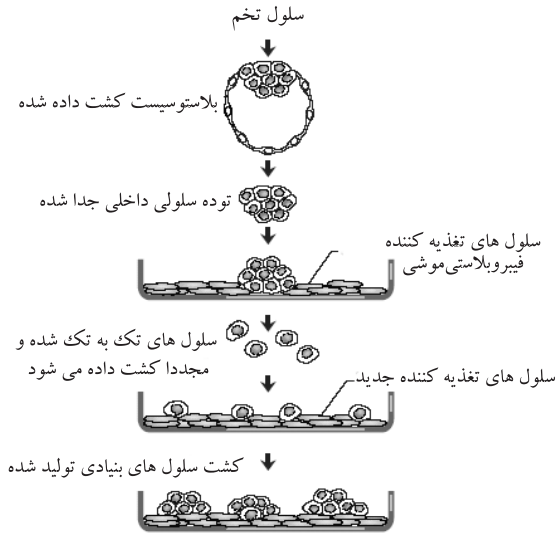
ب) جراحی با کمک ابزار ایمنی (immunosurgery): در این روش از ابزارهای ایمنی یعنی کامپلیمان و آنتی‌بادی استفاده می‌شود. به این ترتیب که در ابتدا آنتی‌بادی خرگوشی علیه سلول‌های موشی به محیط کشت حاوی بلاستوسیست افزوده می‌شود و پس از اتصال آنتی‌بادیها به سلول‌های تروفواکتودرمی که در سطح قرار دارند، بلاستوسیست‌ها به محیط حاوی کامپلیمان خوکچه هندی منتقل می‌شوند. در این زمان کامپلیمان در کنار آنتی‌بادی فعال می‌شود و سلول‌های تروفواکتودرمی را لیز می‌کنند. لازم به ذکر است، از آنجا که ICM در داخل قرار دارد و هیچ‌گونه آنتی‌بادی به آن متصل نمی‌شود، بنابراین به طور سالم باقی می‌ماند. در پایان با پیپت کردن ساده سلول‌های لیز شده به راحتی جدا می‌شوند و ICM باقی می‌ماند.

II) کشت ICM بر سلول‌های تغذیه کننده: کشت سلول‌های تغذیه کننده برای رشد سلول‌های بنیادی جنینی به منظور تامین مواد ناشناخته مورد نیاز سلول‌های بنیادی جنینی است. البته گاهی نیز سلول‌های بنیادی جنینی را بدون سلول‌های تغذیه کننده کشت می‌دهند ولی در این هنگام، کشت سلول‌های بنیادی جنینی نمی‌تواند برای مدت طولانی باشد

زیرا احتمال تمایز خودبه‌خود آنها، حتی در حضور LIF (Leukemia Inhibitory Factor) به عنوان عامل ممانعت کننده تمایز زیاد است. در تمامی موارد، تقسیم سلول‌های تغذیه کننده را قبل از هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی جنینی متوقف می‌کنند. ممانعت از تقسیم سلول‌های تغذیه کننده به دو روش تابش اشعه گاما و یا استفاده از مایتومایسین C انجام می‌شود. مایتومایسین C بین دو رشته DNA قرار می‌گیرد و از جداشدن آنها برای تقسیم ممانعت می‌کند. سلول‌های رایج تغذیه کننده، فیبروبلاست‌های جنینی موش هستند. البته از دودمان STO که یک رده نامیرا از فیبروبلاست موشی هستند نیز استفاده می‌شود. سلول‌های دیگر مانند کارسینومای مثانه انسانی ۵۶۳۷ و یا رده نامیرای تخمدان هامستر چینی (CHO) نیز گاهی در مراحل اولیه تولید سلول‌های بنیادی بکار می‌روند.

III) با تکثیر ICM بر سلول‌های تغذیه کننده و پاساژ آنها بعد از گذشت چند روز بر روی سلول‌های تغذیه کننده، کلونی یا کلونی‌هایی ظاهر می‌شود (شکل ۳). در این هنگام باید آنها را از کف ظرف همراه با سلول‌های تغذیه کننده جدا کرد و پس از تفکیک سلول‌ها از یکدیگر دوباره آن راکشت داد. بعد از گذشت چند روز کلونی یا کلونی‌هایی ظاهر می‌شود در این هنگام باز هم باید آنها را پاساژ داد.

IV) حصول سلول‌های بنیادی جنینی: با پاساژ کلونی‌ها به صورت تک سلولی بر سلول‌های تغذیه کننده جدید، بعد از دو یا سه روز کلونی‌های بزرگتری تشکیل می‌شود. از این به بعد هر دو یا سه روز یکبار باید آنها را پاساژ داد. نکته جالب آن است که می‌توان آنها را به مدت طولانی کشت داد و یا برای سالها منجمد نگاه داشت و در شرایط مطلوب، حالت غیرتمایزی و کاریوتیپ طبیعی خود را برای سالها حفظ می کند.



شکل ۲: مراحل تهیه سلول‌های بنیادی جنینی (۳۱)

مشخصات سلول‌های بنیادی جنینی

در حقیقت منشای سلول‌های بنیادی جنینی مشخص نیست و معلوم نیست که آیا سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌هایی در توده سلولی داخلی بلاستوسیست هستند و یا آن‌که همان توده سلولی داخلی بلاستوسیست تحت شرایط آزمایشگاهی تبدیل به سلول بنیادی جنینی می‌شوند. به هرحال، برای اهداف تحقیقاتی، تعریف یک سلول بنیادی جنینی، بیش از سلول بنیادی با توان تقسیم زیاد مشتق از جنین است که می‌تواند تقریبا به تمام سلول‌های بدن تمایز یابد. بنابراین بیان نکات با اهمیت و خاص در تعریف سلول بنیادی جنینی ضروری است. براساس تعریف آستین اسمیت که مطالعات فراوانی بر سلول‌های بنیادی جنینی موشی دارد، مشخصات ذیل را برای تعریف سلول‌های بنیادی جنینی ضروری می‌داند (۱).

- a) از توده سلولی داخلی (ICM) و یا اپی‌بلاست بلاستوسیست مشتق شده باشد.
- a) دارای توان تقسیم متقارن نامحدود و بدون تمایز باشد و در عین حال توان تمایزی را حفظ نماید (به عبارت دیگر در بلندمدت هم توان خودنوزایی داشته باشد).
- دارای کاریوتیپ طبیعی کروموزومی بوده و این حالت را نیز حفظ نماید.
- سلول‌های بنیادی جنینی پرتوان بتوانند انواع سلول تمایز یافته که مشتق از سه لایه زاینده اولیه جنین (اندودرم، مزودرم و اکتودرم) است را به وجود آورند.
- a, b) طی تکوین، دارای توان ادغام در تمام بافت‌های جنینی باشد (سلول‌های بنیادی جنینی موشی به مدت طولانی در محیط آزمایشگاهی حفظ شده‌اند و هنوز هم پس از آنکه به داخل یک جنین دیگر وارد می‌شوند، می‌توانند هر بافتی را به وجود آورند که حاصل آن ایجاد یک جانور کایمرا است).
- a, b) دارای توان تولید دودمان زاینده (germ line) که در نهایت اسپرم و تخمک را می‌سازد، باشد. به عبارت دیگر قابلیت germ-line transmission را داشته باشد.
- a) کلون‌زایی (clonogenic) به این معنی که یک سلول منفرد دارای توان تولید یک کلونی متشکل از سلول‌های با خواص ژنتیکی یکسان باشد و یا آنکه کلونها دارای خواص مشابه سلول مبدا باشند.
- بیان فاکتور نسخه‌برداری Oct-4. این فاکتور، سبب تحریک یا مهار دسته‌ای از ژنها می‌شود که سلول‌های بنیادی جنینی را در حال تکثیری و غیر تمایزی نگه می‌دارد.
- بتوان آن را به تکثیر و یا تمایز القاء کرد.
- فاقد نقطه کنترل G1 (checkpoint) باشد. سلول‌های بنیادی جنینی، بیشتر زمانشان را در فاز S (سنتز (DNA) هستند. برخلاف سلول‌های سوماتیکی تمایز یافته، سلول‌های بنیادی جنینی نیازی به تحریک بیرونی برای آغاز همانندسازی DNA ندارند.
- سلول‌های بنیادی جنینی، غیر فعال شدن کروموزوم X را نشان نمی‌دهند. در هر سلول سوماتیک پستانداران ماده، یکی از دو کروموزومX، به طوردایم غیر فعال می‌شود. غیر فعال شدن کروموزوم X در سلول‌های بنیادی جنینی روی نمی‌دهد.

[a: این خصوصیت در سلول‌های EG انسانی نشان داده نشده است. b: این خصوصیت در سلول‌های بنیادی جنینی انسانی نشان داده نشده است. تمام خصوصیات فوق در سلول‌های بنیادی جنینی موشی نشان داده شده است].

علاوه بر این سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های کارسینومای جنینی همانند توده سلولی داخلی بلاستوسیست‌های موشی تعدادی از نشانگرهای سطحی سلول‌های پرتوان جنینی را نشان می‌دهند (۳۲). جدول ۱ خصوصیات سلول‌های پرتوان را در موش، میمون و انسان نشان می‌دهد. این نشانگرها برای تفکیک سلول‌های EC و ES موشی از سلول‌های ES و EC انسانی نیز قابل استفاده هستند. مثلا سلول‌های EC و ES موشی SSEA-1 (stage- specific embryonic antigen-1) را بیان می‌کنند، در حالی که سلول‌های EC و ES انسانی آن را بیان نمی‌کنند و در عوض SSEA-4, SSEA-3 را بیان می‌کنند سلول‌های زاینده جنینی (EG) انسانی که ازسلول‌های زاینده بدوی (PGCs) مشتق می‌شوند هر سه نشانگر SSEA-4, SSEA-3,SSEA-1 را بیان می‌کنند. اهمیت زیست‌شناختی الگوی بیان این آنتی‌ژنهای سطحی مشخص‌نیست، اما ممکن است که بیان SSEA-1 در ارتباط با صفت رشد سلول‌ها در محیط آزمایشگاهی باشد. سلول‌های نامتمایز ES و EC انسانی تمایل به رشد به صورت کلونیهای مسطح دارند و در ضمن کلونی‌های آنها نسبتا نامتراکم (loose) است. در مقابل کلونی‌های EC و ES موشی متراکم چندلایه هستند. شق دیگر آن است که احتمالا بیان سطحی SSEAs مختلف انعکاس تفاوت در مراحل تکوینی سلول‌ها باشد. سایر نشانگرهای سلول‌های بنیادی جنینی آنتی‌ژنهای سطحی TRA 1-60،TRA 1-81 و آنزیم آلکالین فسفاتاز است که تمام آنها در انسان و موش بروز می‌کنند. حتی رده هایی از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی و موشی که کاریوتیپ غیر طبیعی دارند شاخص مزبور را بیان می‌کنند (۱۵، ۳۳).

جدول ۱: مقایسه سلول‌های بنیادی پرتوان موش، میمون و انسان (۳۴)

نام نشانگر	سلول‌های کارسینوما/بنیادی/ زاینده جنینی موش	سلول‌های بنیادی جنینی میمونی	سلول‌های بنیادی جنینی انسانی	سلول‌های زاینده جنینی انسانی	سلول‌های کارسینومای جنینی انسانی
SSEA-1	+	−	−	+	−
SSEA-3	−	+	+	+	+
SSEA-4	−	+	+	+	+
SSEA-4	−	+	+	+	+
Tra-1-60	−	+	+	+	+
TRA-1-81	−	+	+	+	+
آلکالین فسفاتار	+	+	+	+	+
Oct-4	+	+	+	ناشناخته	+
فعالیت تلومراز	+ES, EC	ناشناخته	+	ناشناخته	+
وابستگی به سلول‌های تغذیه کننده	ES, EG, some EC	بلی	بلی	بلی	عدادی با بازده کلونی خیلی پایین
فاکتورهای کمک کننده در خودنوسازی سلول بنیادی	LIF و سایر فاکتورهایی که از طریق رسپتور GP130 عمل می‌کند و می‌توانند جانشین لایه تغذیه کننده شوند	هم‌کشتی با سلول‌های تغذیه کننده، سایر فاکتورهای جلوبرنده شناخته نشده‌اند	سلول‌های تغذیه کننده + سرم، لایه تغذیه کننده + محیط کشت بدون سرم + bFGF	LIF, bFGF, فورسکالین	شناخته، با ظرفیت تکثیر پایین
صفات رشد در شرایط آزمایشگاه	تشکیل کلامپ‌های چند لایه گرد منسجم که می‌تواند تبدیل به اجسام شبه جنین شود	تشکیل اجتماعات سلولی مسطح غیر منسجم که می‌تواند تبدیل به اجسام شبه جنبی شود	تشکیل اجتماعات سلولی مسطح غیر منسجم که می‌تواند تبدیل به اجسام شبه جنین شود	تشکیل کلامپ‌های چند لایه گرد که می‌تواند تبدیل به اجسام شبه جنین شود	تشکیل اجتماعات سلولی غیرمستقیم که می‌تواند دیل به اجسام شبه جنینی شود
تشکیل تراتوما در شرایط آزمایشگاهی	+	+	+	−	+
تشکیل کایمر	+	ناشناخته	+	−	+

ES cell : سلول بنیادی جنینی
EG cell: سلول زاینده جنینی
EC cell: سلول کارسینومای جنینی
SSEA: آنتی‌ژن اختصاصی جنین در مرحله‌ای خاص
TRA: آنتی‌ژن رد کننده توموری
LIF: عامل بازدارندهٔ تمایز
bFGF: فاکتور رشد فیبروبلاستی
EB: اجسام شبه جنینی

و سلول‌های زاینده جنینی مشتق از آنها بیان می‌شود (۴۶ ۴۷). نام این فاکتور Nanog است که به معنای سرزمین همیشه جوان می‌باشد. این فاکتور در دومین رخداد تخصصی شدن (specification) سلول‌های جنینی نقش حیاتی دارد. Oct-4 در این مرحله و قبل از آن ایفای نقش می‌کند. فنوتیپ جنین‌های فاقد Oct-4 و Nanog نشان داده است که هویت سلول‌های بنیادی جنینی به فعال نگه داشتن سیستم تنظیم‌کننده سلول بنیادی و خاموش کردن سیستم تمایز بستگی دارد.

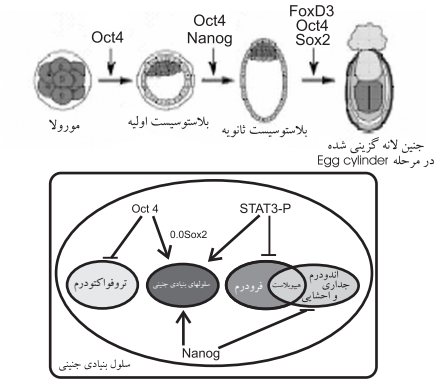
شناسایی Nonog دیدگاه جدیدی را در کشت سلول‌های بنیادی جنینی مطرح کرد، به‌طوری که تاکنون معتقد بودند که حفظ نوزایی سلول‌های بنیادی جنینی به همکاری Stat3 فعال شده (از طریق LIF) و تجلی Oct-4 نیاز دارد. اما نشان داده شده است که بیان زیادی Nanog (overexpression) خود نوزایی سلول‌های بنیادی جنینی را از وابستگی به تحریک LIF/Stat3 خلاص می‌کند. به عبارتی در این شرایط باز هم سلول‌ها به نوزایی خود ادامه می‌دهند. علاوه بر این با بیان زیادی Nanog، قابلیت تمایزی سلول‌های بنیادی جنینی کاهش می‌یابد و به تأخیر می‌افتد. اما حذف بیان زیادی Nanog سبب برگشت سلول‌ها به حالت بنیادی اولیه می‌شود. از سوی دیگر حذف Nanog سبب آغاز تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به اندودرم احشایی می‌گردد و این نشاندهنده نقش آن در دومین رخداد تمایز جنینی‌است. این نتیجه همراه با این مشاهده که LIF و Nanog اثر افزاینده بر خود نوزایی سلول‌های بنیادی جنینی دارند، پیشنهاد می‌کند که این دو عامل دو خزانه هدف ژنی متفاوت را کنترل می‌کنند که تا اندازه‌ای بر هم همپوشانی دارند.

کمبرز و همکاران (۴۶) گزارش کردند که Nanog در سلسله مراتب رونویسی مداخله کننده در هویت سلول‌های بنیادی و حفظ پرتوانی آنها شرکت دارد. به‌طوری‌که بیان زیادی Nanog بر خود نوزایی سلول‌های بنیادی از طریق فعال کردن stat3 عمل نمی‌کنند و برعکس آن فعال کردن stat3 بر بیان Nanog اثر ندارد. علاوه بر این Nanog و Oct-4 به صورت کنسرت در حفظ پرتوانی و نوزایی سلول‌های بنیادی جنینی عمل می‌کند. به‌طوری‌که ایشان مشاهده نمودند اولا: Nanog در جنین‌هایی که از نظر Oct-4 معیوب هستند، بیان می‌شود، ثانیا: بیان زیادی Nanog نمی‌تواند برنامه تمایزی سلول‌های بنیادی جنینی را که با کاهش Oct-4 (downregulation) شروع شده است را برگرداند. بنابراین Nanog,Oct-4, Stat3 با سه مسیر رونویسی متفاوت در سلول‌های بنیادی جنینی عمل می‌کند (شکل ۴).

به نظر می‌آید چرخه سلولی بنیادی جنینی نیز در ممانعت از تمایز آن دخیل است. از مطالعه انواع مسیرهای پیام‌رسانی مشخص می‌شود که فاکتورهای بسیاری باید در تعادل با هم باشند. تا سلول‌های بنیادی جنینی در حالت نوسازی باقی بمانند. اگر در این حالت تعادل، تغییری بوجود آید، سلول‌های بنیادی جنینی تمایز می‌یابند (۴۸).

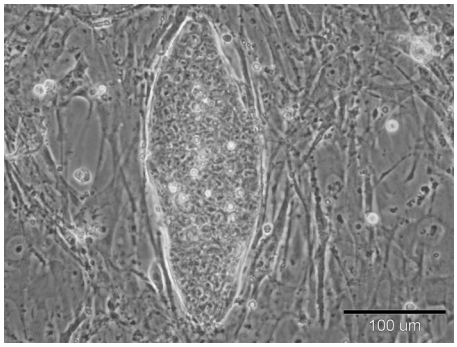
تمایز سلول‌های بنیادی جنینی

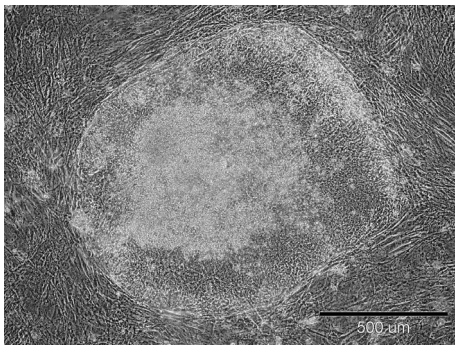
یک هدف از تحقیق بر سلول بنیادی جنینی، تکوین سلول‌های تخصصی نظیر نورونها، سلول‌های عضله قلبی، سلول‌های اندوتلیال عروق خونی و سلول‌های مولد انسولین و غیره است. بنابراین تمایز جهت‌دار سلول‌های بنیادی جنینی برای استفاده غایی از آنها در توسعه درمان‌های جدید بسیار حیاتی است.



شکل ۴: مدل عملکرد سیستم فاکتور رونویسی در جنین ابتدایی موشی و سلول‌های بنیادی جنینی. Oct-4 برای تخصصی شدن اولیه دودمان جنینی و Nanog برای تخصصی شدن ثانویه دودمان جنینی حیاتی است. حفظ پرتوانی اپی‌بلاست جنین‌های لانه‌گزینی گروه نیازمند تجلی FoxD3, Sox2, Oct-4 است. در سلول‌های بنیادی جنینی FoxD3, Sox2, Oct-4 و Nanog برای نوزایی ضروری هستند (۴۹).

سلول‌های بنیادی جنینی قادرند در شرایط آزمایشگاهی و در موجود زنده به انواع فراوانی از سلول‌های بدن تمایز یابند. لذا این سلول‌ها دارای پتانسیل فراوانی در ترمیم و جایگزینی سلول‌ها و بافت‌های آسیب دیده دارند. از جمله مزایای سلول‌های بنیادی جنینی نسبت به سلول‌های بنیادی بزرگسالان توانایی تقسیم نامحدود آنها در محیط آزمایشگاهی و توانایی تمایز وسیع آنها است. معمولا در تمایز سلول‌های بنیادی جنینی این سلول‌ها از سلول‌های تغذیه کننده جدا می‌شوند و به صورت سوسپانسیون در پلیت باکتریایی کشت می‌شوند و تجمعات کروی شکلی مشابه ابتدای جنین بعد از لانه‌گزینی به نام اجسام شبه جنینی (embryoid bodies) تبدیل می‌شوند. اجسام شبه جنینی، شامل مجموعه‌ای از سلول‌های پیشساز تا سلول‌های کاملا تمایز یافته هستند (۵۰). با کشت اجسام شبه جنینی در ظروف کشت بافتی، این اجسام به کف ظرف چسبیده و به انواعی از سلول‌ها نظیر کاردیومیوسیتهای ضربان‌دار، (۵۱) سلول‌های اپی‌تلیال رنگدانه‌دار (pigmented) و بدون رنگدانه، سلول‌های عصبی (شکل ۵) و سلول‌های مزانشیمی تمایز می‌یابند. از سوی دیگر در نهایت تمایز آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی اخیرا دانشمندان موفق به تولید اسپرم و کمک از سلول‌های بنیادی جنین موش شدند (۵۲،۵۳). با تزریق سلول‌های بنیادی جنینی موش به بلاستوسیست میزبان و انتقال بلاستوسیست حاصل به رحم مادر رضاعی (foster) امکان تولید موش کایمر زایا وجود دارد. با تزریق سلول‌های بنیادی جنینی موشی و انسانی به موش‌های SCID (Severe Combined Immunodeficient) می‌توان تراتومسی با انواع مشتقات اکتودرمی (مثل اپی‌تلیوم عصبی)، مزودرمی (نظیر غضروف و استخوان و ماهیچه) و اندودرمی (لوله گوارش) ایجاد نمود.





شکل ۳: کلونیهای موشی (رویان B1) (۱۵) و انسانی (رویان H1) (۳۰) که به ترتیب در سمت بالا و پایین بر سلول‌های تغذیه کننده کشت داده شده‌اند.
(مشاهده نمونه رنگی تصویر در انتهای مقالات)

حفظ سلول‌های بنیادی جنینی در حالت نامتمایز

همان‌طور که گفته شد یک سلول بنیادی واقعی، قابلیت حفظ نوسازی خود یا به عبارتی توانایی ایستایی در حالت غیرتمایزی را به طور نامحدود دارد. حالت غیرتمایزی سلول بنیادی جنینی با نشانگرهای سلولی خاص نشان داده می‌شود. این نشانگرها به دانشمندان کمک می‌کند تا درک بهتری از تکثیر نامحدود سلول‌های بنیادی جنینی در شرایط مطلوب کشت داشته باشند. تاکنون، دو مسیر اصلی تحقیق، شواهدی را نشان داده که یک مسیر شامل کوشش‌هایی است که تاثیر فاکتورهای ترشحی نظیر فاکتور ممانعت کننده لوکمیایی (LIF) بر سلول‌های بنیادی جنینی موش در محیط آزمایشگاهی را بررسی می‌کند و مسیر دوم تحقیق، فاکتورهای نسخه‌برداری نظیر Oct-4 را دربر می‌گیرد.

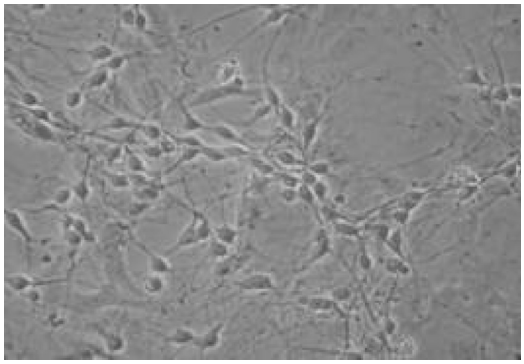
فاکتور ممانعت کننده لوکمیایی (LIF)، سایتوکاین متعلق به خانواده IL-6 است که برای اولین‌بار با تاثیر بر القای تمایز سلول‌های لوکمیایی MI شناخته شد (۳۵). اما در سال ۱۹۸۸ اثر ممانعت‌کنندگی آن بر تمایز سلول‌های بنیادی جنینی موشی شناخته شد (۳۶). افزودن LIF بر تولید و حفظ سلول‌های بنیادی جنینی در حضور سرم جنینی گاوی بدون نیاز به سلول‌های تغذیه کننده کافی است (۳۷). این موضوع نشان می‌دهد که این فاکتور، یک فاکتور خارجی منحصر به فرد برای نوسازی دائم بنیادی جنینی است. عملکرد LIF تنها برای جلوگیری از تمایز سلول‌های بنیادی جنینی است و عمل تکثیر سلول‌های بنیادی جنینی مستقل از LIF است (۳۸). جالب آن است که LIF در سلول‌های لوکمیایی القاکننده تمایز است ولی بر سلول‌های بنیادی جنینی موش اثر ممانعت کنندگی از تمایز دارد. به همین دلیل به آن فاکتور ممانعت‌کننده تمایز (DIF) نیز می‌گویند. این فاکتور از طریق گیرنده خود به نام stat 3 عمل می‌کند.

Oct-4 پروتئینی است که توسط سلول‌های بنیادی جنینی انسانی و موشی در محیط آزمایشگاهی بیان می‌شود. این فاکتور توسط سلول‌های ICM موشی در in vivo نیز بیان می‌گردد. Oct-4 در زیگوت موش وجود دارد و در سراسر بلاستوسیست تا ظهور ICM (۳۹) و حفظ پرتوانی ICM و اپی‌بلاست (۴۰) وجود دارد. همچنین Oct-4 در سلول‌های زاینده موش و سلول‌های زاینده بالغ وجود دارد (۴۱). سلول‌های بنیادی جنینی موشی می‌توانند به طور نامحدود در محیط آزمایشگاهی همانندسازی کنند و ۹۱۰ تا ۱۰۱۰ (میلیارد ۱۰ـ۱) سلول را بدون تمایز بوجود آورند. در محیط آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی جنینی موشی و انسانی Oct-4 را بیان می‌کنند.

برای حفظ پرتوانی سلول‌های بنیادی جنینی، بیان Oct-4 لازم است. به‌طوری‌که اگر از بیان Oct-4 جلوگیری نماییم، سلول‌های بنیادی جنینی به تروفواکتودرم تمایز می‌یابند. اگر بیان Oct-4 را به طور مصنوعی زیاد کنیم، سلول‌های بنیادی جنینی موش به اندودرم و مزودرم ابتدایی تمایز می‌یابند. بنابراین مقدار بیان Oct-4 وضعیت برنامه تکوینی سلول‌های بنیادی جنینی موش را نشان می‌دهد. و آن را به‌عنوان پروتیین کاندیدای تنظیم‌کننده اصلی پرتوانی سلول‌های بنیادی جنینی معرفی می‌کند (۴۰).

چگونه و چرا فاکتور نسخه‌برداری Oct-4 چنین نقش مهمی را در جنین زایی ایفا می‌کند به ژنهایی تحت کنترل آن، بستگی دارد. تاکنون مشخص شده ۷ تا ۸ ژن تحت کنترل Oct-4 هستند. به طوری که Oct-4 بعضی از آنها را فعال کرده و یا از فعالیت بعضی دیگر ممانعت می‌کند. در کل ممکن است Oct-4، سبب ممانعت از عمل ژن‌هایی شود که برای تمایز لازم هستند (۴۱).

تاکنون، معتقد بودند موضوع پرتوانی سلول‌های بنیادی جنینی به چهار بازیگر مهم یعنی Sox2, Oct-4 , FoxD3 و Stat3 برمی‌گردد (شکل ۴). اما اجرای کنسرت مزبور (پرتوانی) با هیچ کدام از عوامل مزبور به تنهایی شروع نمی‌شود چراکه ظاهرا به بازیگرانی دیگر نیاز است. Oct-4 برای تنظیم سرنوشت سلولی در جنین ابتدایی ضروری است و در توده سلولی داخلی بیان می‌شود. و بیان آن در تروفوبلاست کاهش می‌یابد (۳۹). Sox2 و FoxD3 دیرتر در جنین بیان می‌شوند و در حفظ اپی‌بلاست بعد از لانه‌گزینی ضروری هستند (۴۲،۴۳). در سلول‌های بنیادی جنینی، Stat3 با سیتوکین LIF فعال می‌شود و این فرآیند برای حفظ نوزایی آنها ضروری است (۴۴). اما برای تکوین طبیعی موش به LIF نیازی نیست (۴۵). تا به امروز دو فاکتور رونویسی Stat3 و Oct-4 شناخته شده‌اند که در نوزایی سلول‌های بنیادی جنینی شرکت دارند. اما اخیرا یک فاکتور رونویسی همئوباکس شناخته شده که در سلول‌های داخلی مورولا وبلاستوسیست، سلول‌های زاینده اولیه، سلول‌های زاینده اولیه و سلول‌های بنیادی جنینی



شکل ۵: سلول‌های عصبی تولید شده از سلول‌های بنیادی جنینی رویان B1 (۵۴)

تشکیل بافت‌های سازمان یافته طی جنین‌زایی طبیعی توسط بسیاری از رخدادهای القایی و در بر هم کنش پیچیده مزانشیمی – اپی‌تلیایی ایجاد می‌شود. از آن‌جا که ما در مورد اجزای دقیق القا کننده تنظیم الگوزایی جنین اطلاعات کاملی در دست نداریم، نمی‌توانیم چنین الگویی را به طور کامل در محیط آزمایشگاهی ایجاد کنیم. لذا روش‌های مختلفی را برای ایجاد تمایز جهت‌دار در محیط آزمایشگاهی می‌توان در نظر گرفت که از آن جمله می‌توان به موارد ذیل اشاره کرد (این موارد در ادامه توضیح داده خواهد شد):

۱) اضافه کردن فاکتور یا فاکتورهای رشد یا مورفوژنهای شیمیایی (نظیر رتینوئیک اسید) به صورت منفرد و یا با هم

۲) هم‌کشتی سلول‌های بنیادی جنینی با بافت‌ها یا سلولهای القاکننده

۳) پیوند سلول‌های بنیادی جنینی به نواحی یا اندام‌های خاص

۴) تجلی زیادی فاکتورهای رونویسی مرتبط به تکوین بافت‌های خاص

۵) انتخاب سلول‌هایی که یک مسیر خاص تجلی ژنی از دودمانی سلولی را بیان می‌کنند

۶) انتخاب سلول دلخواه با FACS (Fluorescence-activated cell sorting)

بعضی از این روش‌ها برای غنی‌سازی یک سلول تمایزیافته خاص از سلول‌های بنیادی جنینی در شرایط آزمایشگاهی به کار می‌روند که بعدا بیشتر توضیح داده خواهد شد.

تاکنون روش عمومی برای تمایز جهت‌دار سلول‌های بنیادی جنینی، تغییر شرایط کشت سلول‌های بنیادی جنینی نظیر افزودن فاکتورهای رشد به محیط کشت و یا تغییر اجزای شیمیایی سطحی بوده است که سلول‌های بنیادی جنینی بر آن رشد نموده‌اند. برای مثال ظروف کشت پلاستیکی که برای کشت سلول‌های بنیادی جنینی انسانی و موشی به کار می‌روند را می‌توان با مواد مختلفی که به سلول‌ها اجازه چسبیدن می‌دهند و یا از چسبیدن آنها ممانعت می‌کنند، تیمار کرد. در کل یک ماده چسبنده به مهار برهم‌کنش و تمایز سلول‌های بنیادی جنینی کمک می‌کند. در مقابل یک ماده ممانعت کننده چسبیدن (nonadherent) به سلول‌های بنیادی جنینی کمک می‌کند تا به یکدیگر متصل شوند و برهم کنش دهند. بر هم کنش‌های سلول با سلول برای تکوین طبیعی جنین بسیار مهم می‌باشند. بنابراین تقلید برهم کنش‌های طبیعی که در بدن موجود زنده رخ می‌دهند، در محیط آزمایشگاهی، استراتژی مهم القای تمایز سلول بنیادی جنینی انسانی و موشی است. علاوه بر این افزودن فاکتورهای رشد خاص به محیط کشت سبب آغاز فعالیت یا عدم فعالیت ژن‌های خاصی در سلول‌های بنیادی جنینی می‌شود. این عمل سبب شروع یک سری رویدادهای مولکولی می‌شود که سلول‌های مزبور را به مسیر تمایزی خاصی سوق می‌دهد.

راه دیگر برای تمایز جهت دار سلول‌های بنیادی جنینی، دخول ژن‌های خارجی به سلول‌ها از طریق ترانس فیکاسیون و یا روش‌های دیگر است. نتیجه این استراتژی‌ها، آن است که یک ژن فعال را به ژنوم سلول بنیادی جنینی اضافه نمایند و به دنبال آن سلول‌های مزبور وارد مسیر تمایزی خاصی بشوند. به نظر می‌آید که این راه روش دقیقی برای تنظیم تمایز سلول بنیادی جنینی است، اما برای این کار لازم است که مشخص شود که کدام ژن، در چه مسیر تمایزی خاصی باید فعال شود. بنابراین آن ژن باید در زمان مناسب یعنی در مرحله مناسب تمایز فعال شود و باید به داخل ژنوم و در محل مناسب وارد شود.

طی چند سال گذشته انواعی از سلول‌های تمایز یافته خاص و با عملکرد با دست‌کاری شرایط کشت سلول‌های بنیادی جنینی در محیط آزمایشگاهی تولید شده‌اند. اما در حال حاضر امکان توصیف رخداد تمایز جهت‌دار وجود ندارد و کسی نمی‌داند که چگونه یا کی، بیان ژنی تغییر می‌کند، چه سیستم‌های انتقال پیامی فعال می‌شوند و یا چه برهم‌کنشهای سلولی باید رخ دهد تا سلول‌های تمایز نیافته بنیادی جنینی به سلول‌های پیش‌ساز و در نهایت به سلول‌های تمایز یافته که از نظر ظاهر و عملکرد مشابه محیط in vivo هستند، تبدیل شوند. نشان داده شده است که سلول‌های بنیادی جنینی قابلیت تمایز به انواع گوناگونی از سلول‌ها را دارند. برای مثال سلول‌های بنیادی جنینی موش می‌توانند در محیط آزمایشگاهی تمایز یابند و ساختارهای رگی(۵۵)، نورون‌های رها کننده دوپامین و سروتونین (۵۶)، سلول‌های اندوکرینی جزایر پانکراس (۵۷) را به‌وجود آورند. در تمام موارد فوق سلول‌های بنیادی جنینی موشی در حالت تمایز نیافته به عنوان سلول اولیه هستند و نتیجه تمایز آنها، تولید سلول‌های تمایز یافته مذکور است. شروع تمایز سلول بنیادی جنینی موشی با حذف سایتوکاین LIF که تقسیم سلول‌های بنیادی جنینی موشی را افزایش می‌دهد، نیز آغاز می‌شود. علاوه براین، به هنگام تمایز، سلول‌های بنیادی جنینی به هم وصل می‌شوند، به طوری که در محیط سه بعدی آنها تغییری به وجود می‌آید که احتمالا شرایط بعضی از برهم‌کنش‌های سلولی را مانند in vivo در شرایط آزمایشگاهی فراهم می‌کند. در مجموع، این سه مطالعه مثال‌های خوبی در تمایز جهت‌دار هستند. دو مطالعه از این سری نشان داده که یک سلول پیش‌ساز می‌تواند انواع گوناگونی از سلول‌های تمایزیافته را به وجود آورد (۵۵، ۵۶، ۵۷) و هر سه نشان داده‌اند که سلول‌های تمایزیافته حاصل، همچون مشابه‌های خود در in vivo عمل می‌کنند. این دو خصوصیت یعنی توانایی یک سلول در تولید انواع سلول‌ها و با صفات عملکردی، اساس یک آزمون قوی برای همه مدعیان تمایز جهت‌دار از سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی غیرجنینی (adult) است. متاسفانه تعداد کمی

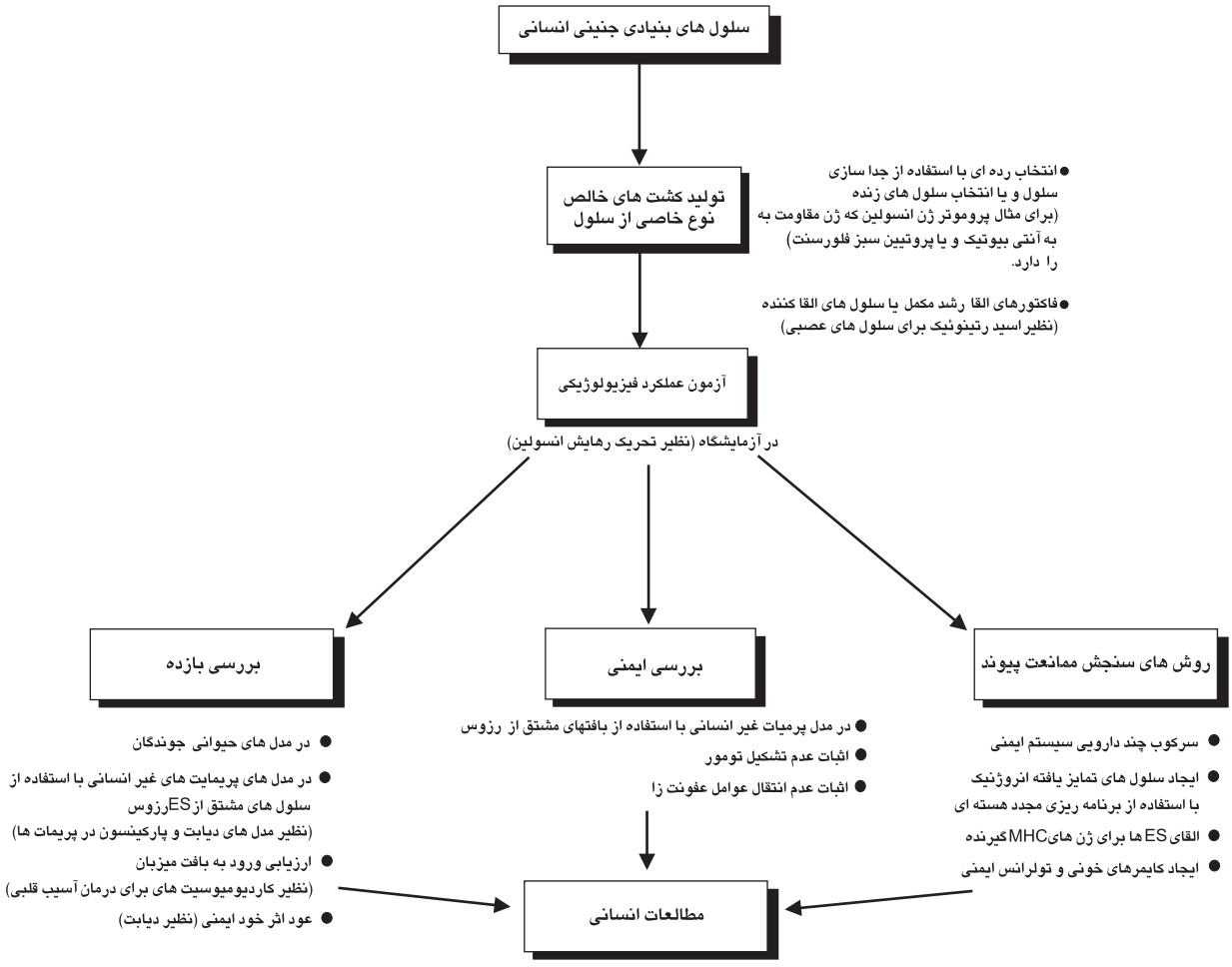
از تجربیات این صفات را نشان می‌دهد. جدول (۲) خلاصه‌ای از انواع سلول‌های تمایز یافته سلول‌های بنیادی جنینی موش را نشان می‌دهد (۱).

کاربردهای بالقوه سلولهای بنیادی جنینی

سلول‌های بنیادی دارای کاربردهای گوناگونی هستند که مشخص‌ترین آنها توان بالقوه این سلول‌ها در درمان بعضی بیماریها است (جدول ۲). مطالعه مدل‌های حیوانی نشان داده است که پیوند سلول‌های بنیادی جنینی و یا سلول‌های بزرگسالان در درمان موفقیت‌آمیز بسیاری از بیماری‌های مزمن نظیر پارکینسون، دیابت و آسیب نخاعی، دیستروفی ماهیچه‌ای دوشن، نقصان کبدی یا قلبی و استخوانی اهمیت دارد.

جدول ۲: مثال‌هایی از تمایز سلول‌های بنیادی جنینی موشی به سلول‌های سوماتیک فعال

نتیجه تمایز	روش تمایز	آزمون فعال بودن	مآخذ
نورون‌های حرکتی	تحریک با رتینوئیک اسید و sonic hedgehog	ادغام (integration) در نخاع جوجه، عصب زایی به ماهیچه	۵۸
نورون‌های مغز میانی	تجلی مداوم فاکتور ۱ خانواده گیرنده هسته‌ای	تولید دوپامین و بازیافت رفتاری در مدل پارکینسونی رت	۵۹
سلول‌های شبه جزایر پانکراسی	انتخاب سلول‌های بیان کننده انسولین	ترشح انسولین و نرمال‌سازی مقدار قند خون در موش‌های دیابتی	۶۰
پیش‌سازهای خون‌ساز	تجلی موقت پروتیین همئوباکس HoxB4	پیوند میلویید و لنفویید در موش‌های تشعشع یافته، پیوند به دریافت کننده‌های دوم	۶۱



شکل ۶: اهداف اصلی و پیوند سلول‌های بنیادی جنینی انسانی (۳۱)

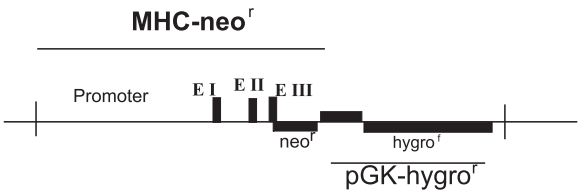
اگرچه در سال‌های اخیر پیشرفت قابل ملاحظه‌ای در طب پیوند انسانی به وجود آمده است. هنوز موانع زیادی در راه کاربرد وسیع طیف پیوند سلولی تحت این شرایط وجود دارد (شکل ۶) (۶۲). مانع اصلی در این زمینه به‌کارگیری داروهای سرکوب‌کننده ایمنی برای جلوگیری از دفع بافت پیوندی و کمی مردگان دهنده اندام‌ها است. در این راه، سلول‌های بنیادی انسانی، منبع نامحدودی از سلول‌ها فراهم می‌کنند که به‌آسانی قابل دسترسی است. علاوه بر این امکان تغییر ژنتیکی سلول‌های بنیادی وجود دارد به طوری که بعد از پیوند دفع نشوند.

گام اول در توسعه موفق درمان بیماری‌های انسانی با سلول‌های بنیادی ایجاد شرایط مناسب برای تمایز سلولی به سلول دلخواه و خالص‌سازی آن دودمان از جمعیت سلولی است.

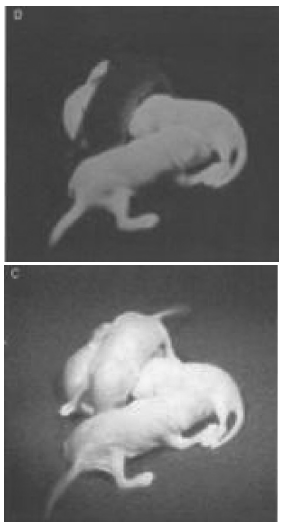
متاسفانه، سلول‌های بنیادی جنینی به صورت جمعیت ناهمگنی از سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی تمایز می‌یابند و این موضوع استفاده از آنها را محدود کرده است. ندرتاً به‌کارگیری فاکتورهای رشد و یا شرایط کشتی خاص، امکان تولید یک نوع سلول به خصوص را فراهم کرده است (۵۰، ۶۳). در حقیقت علی‌رغم افزودن فاکتورهای رشد خاص، سلول‌های بنیادی جنینی انسانی گستره وسیعی از تجلی ژن‌ها را دارند (۵۰، ۶۳). علاوه بر این، تنوع قابل توجهی در تمایز سلولی در کشت‌های با فاکتورهای رشد یکسان دیده می‌شود. با توجه به این‌موضوع، استخراج یک جمعیت نسبتا همگون در مخلوطی از سلول‌ها نیازمند انتخاب (selection) است. یک راه برای این کار، به‌کارگیری پروموتر خاص بافتی و یک نشان‌گر نظیر ژن مقاوم به آنتی بیوتیک است (۶۰، ۶۴، ۶۵).

راه دیگر، انتقال یک سازه ژنی (gene construct) حاوی یک پروموتر خاص بافتی کنترل کننده تجلی ژن پروتئین فلورسنس سبز (Green Fluorescence Protein: GFP) است. در این راه، سلول‌های دلخواه که بیان کننده GFP هستند با (Fluorescence-Activated Cell Sorting) FACS جدا می‌شوند. این روش همچون انتخاب و جداسازی سلول‌های بنیادی خون‌ساز $CD34^+$ برای پیوند سلولی است. هر کدام از روش‌های فوق به بازدهی روش‌های انتقال ژن به سلول‌های بنیادی مرتبط است.

به عنوان مثال می‌توان سلول‌های بنیادی جنینی را به گونه‌ای دست‌کاری ژنتیکی کرد که در نهایت محصول خالص، کاردیومیوسیت باشد (۶۶). برای این منظور از حاملی استفاده می‌شود که شامل دو بخش باشد (شکل ۷). بخش اول شامل پروموتری است که در سلول‌های بنیادی جنینی تمایز نیافته بیان می‌شود و به یک ژن نشان‌گر متصل است. برای مثال پروموتر فسفوگلیسیرات کیناز (PGK) به عنوان ژنی که در تمام سلول‌ها بیان می‌شود و ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک هایگرومایسین ($hygro^r$) تحت عنوان $PGK\text{-}hygro^r$ بخش اول را می‌سازد. بخش دوم که برای غنی‌سازی سلول مورد نظر است. مثلا شامل پروموتر زنجیره سنگین میوزین آلفای قلبی و ژن آمینوگلیکوزیدفسفوترانس فراز باشد. این بخش تحت عنوان $MHC\text{-}neo^r$ است. ژن آمینو گلیکوزید فسفوترانس فراز، مقاومت به آنتی‌بیوتیک نئومایسین را فراهم می‌کند. با این روش می‌توان جمعیت خالصی از کاردیومیوسیت‌ها را پس از تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سمت سلول‌های قلبی به دست آورد. به طوری که در ابتدا سازه (construct) $nero^r/PGK\text{-}hygro^r$ با کمک الکتروپوریشن به سلول‌های بنیادی جنینی وارد می‌شود. سپس با افزودن هایگرومایسین سلول‌های بنیادی که‌این حامل به آنها وارد شد باقی می‌مانند و بقیه سلول‌ها از بین می‌روند. سپس القای سلول‌های بنیادی جنینی حاوی سازه به سمت قلب‌زایی سوق داده می‌شوند و در مرحله نهایی geneticin (G418) به محیط اضافه می‌شود. از آنجا که پروموتر α-MHC تنها در کاردیومیوسیت‌ها فعال است و تنها این سلول‌ها آمینوگلیکوزیدفسفوترانس فراز را بیان می‌کنند. با تیمار G418، تنها کاردیومیوسیت‌ها باقی می‌مانند. اگر این مثال غنی‌سازی بر اساس مقاومت به آنتی‌بیوتیک بود ولی می‌توان از روش‌هایی نظیر پروتیین فلورسنت سبز (GFP) به عنوان نشان‌گر سلولی تحت کنترل پروموتر دلخواه و سپس انجام (FACS) نیز استفاده نمود. بدین ترتیب بیش از ۹۹درصد خلوص سلول مورد نظر به دست آمده است. در ضمن با کمک همین روش می‌توان موش‌های ترانس ژن سبز که بیان کننده GFP هستند ساخت (شکل ۸).



شکل ۷: سازه حامل پروموتر ژن اختصاصی قلب (MHC) و یک پروموتر ژن عمومی (PGK) است. :Eاگزون.



شکل ۸: موش‌های ترانس ژن سبز رنگ در بالا پس از تابش نور ماوراء بنفش و همان موش‌ها با نور معمولی در پایین.

(مشاهده نمونه رنگی تصویر در انتهای مقالات)

دوم آن‌که ارزیابی عملکرد طبیعی و فیزیولوژیک سلول‌های تمایز یافته ضروری است به عنوان مثال، سلول‌های جزایر پانکراسی حاصل بتوانند در مقابل گلوکز، پاسخ طبیعی بدهند. مطالعات قبلی تولید بسیاری از سلول‌های تمایز یافته از سلول‌های بنیادی جنینی موشی از جمله کاردیومیوسیت‌ها و نورون‌های دوپامینرژیک را نشان داده است. این سلول‌ها کاملا تمایزیافته بودند و خصوصیات فیزیولوژیکی طبیعی در شرایط موجود زنده و محیط آزمایشگاه را نشان دادند (۶۷، ۶۸). اما نکته مهم آن است که مجموعه‌های تمایز یافته سلول‌های بنیادی جنینی دارای پیش‌سازهای چند توان و سلول‌های تمایز یافته هستند (۶۹). از آنجا که بافت‌های جنینی و رویانی و نیز پیش‌سازهای چند توان از نظر عملکرد نابالغ هستند، نمی‌توان گفت که تمام دودمان حاصل‌از سلول‌های بنیادی دارای عملکرد طبیعی فیزیولوژیک هستند.

نکته مهم سوم در مسیر آزمون‌های درمانی، مشاهده بازدهی در مدل‌های بیماری در جوندگان و جانوران بزرگ است. سلول‌های بنیادی جنینی میمون (rhesus)، مدل پیش درمانی عالیی را برای پیوند سلولی و بررسی روش‌های جلوگیری از پیوند را فراهم می‌کنند. در واقع برای بیماران پارکینسون و دیابت قندی مدل‌های خوبی با استفاده از میمون فراهم شده است (۷۱،۷۰).

در این خصوص یکپارچه شدن سلول‌های پیوندی از نظر ساختاری و عملکردی در بافت میزبان بسیار مهم است. برای مثال پیوند خوب کاردیومیوسیت‌های مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی در ماهیچه قلبی بسیار مهم است. به طوری‌که به طور هماهنگ با سایر بخش‌ها منقبض شود و جریان خون جدیدی را دریافت کند.

چهارم آن‌که، پیوند مشتقات سلول‌های تمایز یافته از سلول‌های بنیادی جنینی به انسان ممکن است سبب ایجاد تومور از سلول‌های بنیادی جنینی شود. پیوند سلول‌های تمایز نیافته انسانی به جانوران سبب ایجاد تراتومای خوش خیم می‌شود (۱۲، ۱۴). این تومورها متاستازی نیستند و حیوان میزبان را به سرعت نمی‌کشند. رشد تومور در جانورانی که نقص ایمنی دارند، به وجود جمعیت سلول‌های بنیادی در کشت‌های تمایز نیافته دارد. بنابراین با تمایز کامل سلول‌های بنیادی جنینی، جمعیت سلول‌های تمایز نیافته کاهش یافته و بنابراین احتمال تشکیل تومور از بین می‌رود. در ضمن آن‌که ایده دیگر فعال کردن ژن مرگ سلولی در سلول‌های بنیادی جنینی در مرحله نهایی تمایز، به‌عنوان راه دیگر، سبب مرگ سلول‌های بنیادی باقی‌مانده و جلوگیری از ایجاد تومور پس از پیوند سلول‌های تمایز یافته مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی می‌شود.

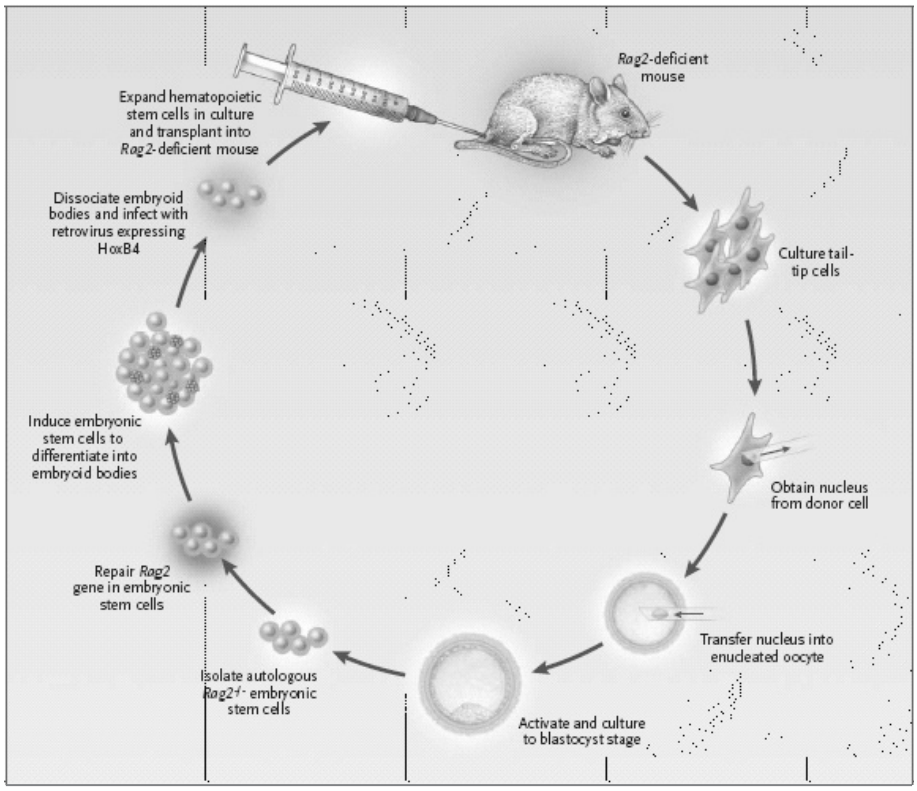
در حقیقت در مطالعات کوتاه مدت معدودی که انجام شده است، مشخص شده که دودمان تمایزیافته پیوندی مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی موش به جوندگان بالغ سبب تومور قابل ملاحظه‌ای نشده است (۶۰، ۶۴، ۷۲، ۷۳). لذا از نظر تعداد جانور مورد ارزیابی و بقای طولانی مدت آنها، مورد توجه قرار نگرفته است. اگر ایجاد تومور به حضور جمعیت سلول‌های بنیادی بستگی داشته باشد، یک راه برای حذف سلول‌های بنیادی باقیمانده از سلول‌های تمایز یافته، احتمالا براساس انتخاب منفی سلول‌های بیان کننده Oct-4 است. بدین معنی که هر سلولی که Oct-4 را در این زمان بیان می‌کند، بمیرد.

استفاده از انتخاب مثبت بر سلول‌های تمایز یافته نیز سلول‌های تمایز نیافته را از بین می‌برد. مثلا در جمعیت سلول‌های مولد انسولین، به‌کارگیری یک ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک تحت کنترل پروموتر انسولین و در فاز نهایی افزودن آنتی‌بیوتیک، سلول‌های دیگر به غیر از سلول‌های مولد انسولین را از بین می‌برد. گذشته از وجود سلول‌های بنیادی احتمال ترانسفورماسیون بدخیم مشتقات حاصل نیز باید مورد توجه قرار گیرد. در نهایت همان‌طور که پتانسیل رشد تومور باید مورد توجه قرار گیرد، روش جلوگیری از تومور هم باید مورد توجه قرار گیرد. این روش‌ها باید در میمون قبل از به‌کارگیری بر انسان ارزیابی شود.

نکته مهم دیگر، جلوگیری از دفع پیوند سلول‌های مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی است (۷۴) که بدین منظورروش‌های مختلفی مدنظر می‌باشد که به آن اشاره می‌شود. برای جلوگیری از دفع پیوند سلول‌های مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی روش‌های متعددی پیشنهاد شده است. اما متاسفانه، استفاده از داروهای سرکوب کننده ایمنی عوارض جانبی فراوانی دارد. در عوض امکان دست‌کاری ژنتیکی سلول‌های بنیادی جنینی انسانی برای کاهش یا حذف دفع به واسطه ایمنی وجود دارد. به طوری‌که به استفاده از داروهای سرکوب کننده ایمنی برای کل عمر نیاز نمی‌باشد.

یک راه بالقوه برای کاهش پاسخ ایمنی، کاهش ایمونوژنسیته سلول‌های پیوندی است. با به‌کارگیری نوترکیبی هومولوگ برای knockout کردن مولکول‌های کمپلکس اصلی سازگاری بافتی I و II (MHC) در سلول‌های بنیادی جنینی موشی از کار انداخته شده است (۷۵). اما با این حال پیوندهای پوستی فاقد MHC کلاس I,II احتمالا به دلیل allo-rejection غیرمستقیم و یا به واسطه سلول‌های کشنده طبیعی دفع می‌شوند (۷۵). بنابراین احتمالا، علاوه بر حذف ژن‌های MHC خارجی باید ژن‌های MHC دلخواهی را وارد کرد (Knock-in) تا سلول‌های حاصل از سلول‌های بنیادی جنینی خودی تلقی شود (۷۶، ۷۷). راه دیگر آن است که ژن‌های مولکول‌های سرکوب‌کننده ایمنی نظیر لیگاند Fas به سلول‌های بنیادی جنینی وارد شونده یا پروتیین‌های مهم محرک ایمنی نظیر آنتی‌ژن‌های B7 یالیگاند CD40، را می‌توان از سلول‌های بنیادی جنینی حذف کرد (۷۸، ۷۹). صرف‌نظر از روش مورد استفاده، تغییرات ژنتیکی در سلول‌های بنیادی جنینی پایدار هستند و این یک مزیت در استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی نسبت به سلول‌های بنیادی بزرگسالان است.

ایمنی‌زایی پیوند سلولی یا بافتی از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی چگونه است؟ در واقع ایمنی‌زایی بافت‌ها در کل با پروفایل تجلی آنتی‌ژن MHC و فراوانی سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن نظیر سلول‌های دندرتیکی درون بافت مرتبط است. تجلی MHC مشتقات سلول‌های بنیادی جنینی انسانی به درجه تمایز و یا نوع سلولی مشتق شده خاص بستگی دارد. برای مثال سلول‌های سوماتیک بزرگسالان به طور طبیعی تنها آنتی‌ژن‌های کلاس MHC I را بیان می‌کنند. ولی سلول‌های B ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیکی هر دو آنتی‌ژن‌های کلاس I و II را بیان می‌کنند.



شکل ۹: مدل موشی همانندسازی درمانی (۸۷)

علاوه بر این، در حالی که بیشتر اندام‌ها و بافت‌های بزرگسالان در برگیرنده سلول‌های دندریتیکی و سلول‌های اندوتلیال عروق به عنوان سلول‌های محرک ایمنی هستند، اجزا در پیوندهای بافتی یا سلولی مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی را می‌توان حذف کرد. حذف اختصاصی سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن از پیوندهای اندام، عموماً بقای پیوند را افزایش می‌دهد (۸۰، ۸۱). در نتیجه ممکن است بعضی بافت‌های مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی، ایمونولوژیک نباشند، در حالی که سلول‌هایی نظیر سلول‌های خون‌ساز، به‌عنوان بافت‌های طبیعی بزرگسالان ایمنی‌زا باشند. بنابراین پیوندهای مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی ممکن است در بعضی موارد یک مزیت ایمونولوژیک ذاتی در مقایسه با بافت‌های مرده‌های انسانی داشته باشند.

فن‌آوری انتقال هسته ممکن است، ابزار دقیق‌تری را برای ممانعت از دفع پیوند سلول‌های پیوندی فراهم نماید (۸۲). این روش منجر به تولید سلول‌های مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی می‌شود که از نظر ژنتیکی مطابق با فرد میزبان است. در این روش که همان همانندسازی درمانی(Therapeutic cloning) است، کمترین پاسخ ایمنی در میزبان ایجاد می‌شود، زیرا تمام ژن‌های هسته‌ای از جمله لوکوس‌های اصلی و فرعی سازگاری بافتی از خود میزبان می‌باشند. در این روش، هسته از یک سلول سوماتیک بیمار تهیه می‌شود و سپس به تخمک بدون هسته وارد می‌گردد. سیتوپلاسم هسته قابلیت برنامه‌ریزی مجدد هسته‌های تمایز یافته و تجلی ژن‌های جنینی را دارد. لذا با تشکیل بلاستوسیست رده جدیدی از سلول‌های بنیادی جنینی از آن تهیه می‌شود که از نظر ژنتیکی با هر ژن هسته‌ای بیمار تطابق دارد. در این راه، پتانسیل دفع ایمنی پیوند تنها به اختلافات فرعی آنتی‌ژنی مربوط به ژن‌های میتوکندریایی و یا فرآیند خودایمنی نظیر دیابت می‌گردد. با ادغام یک سلول کامل با یک تخمک بی‌هسته، ممکن است برخی از اختلافات ژنتیکی باقی‌مانده به حداقل برسد. در حقیقت در گاو و موش، محققین با فن‌آوری انتقال هسته، سلول‌های بنیادی جنینی ترانس ژنی را از برنامه‌ریزی مجدد هسته‌های سلول‌های سوماتیکی تهیه کرده‌اند (۸۲، ۸۳). اخیرا نیز تولید رده سلول بنیادی جنینی انسانی طی فناوری انتقال هسته (یا همانندسازی‌درمانی) نیز گزارش شده است (۸۴). در مقابل این روش، همانندسازی تولید مثلی (مولد) قرار دارد که طی آن یک فرد کامل ایجاد می‌شود که این موضوع از نظر اخلاقی در بسیاری از کشورها غیرقانونی و غیراخلاقی است.

در مدل موشی ادغامی از همانندسازی درمانی، ژن درمانی و سلول درمانی برای درمان یک بیماری ژنتیکی استفاده شده است (۸۲) (شکل ۹). در این مورد از موش SCID جهش یافته Rag 2 که از نظر ایمنی نقص دارد و در ژن (Rag 2 recombination- activating gene2) دارای جهش است استفاده شد. ژن Rag 2 بازآرایی‌های گیرنده‌های ایمنی در

لنفوسیت‌ها را کاتالیز می‌کند. موش جهش‌یافته فاقد سلول‌های بالغ B,T است که شبیه سندرم Omenn در انسان است. در این آزمایش سلول‌های فیبروبلاستی دم موش‌های جهش یافته Rag 2 جدا و هسته آنها به تخمک‌های بی‌هسته تزریق گردید. سپس جنین حاصل تا مرحله بلاستوسیست رشد یافت و از آن سلول‌های بنیادی جنینی تهیه گردید. به دنبال آن یک آلل جهش یافته Rag 2 در سلول‌های بنیادی جنینی حاصل با روش نوترکیبی همولوگ هدف‌گیری شد تا ساختار ژن طبیعی ایجاد گردد. سپس برای انجام درمان، سلول‌های بنیادی جنینی دست‌کاری شده به اجسام شبه جنینی که دارای انواع سلول‌های سوماتیک هستند و نهایتا به پیش‌سازهای خون‌ساز بیان کننده HoxB4 متمایز شدند. به دنبال آن سلول‌های پیش‌ساز خون‌ساز حاصل به موش‌های فاقد Rag 2 که اشعه دریافت کرده بودندتزریق شدند. تلاش‌های اولیه برای پیوند این سلول‌ها به دلیل افزایش سلول‌های کشنده طبیعی در میزبان جهش یافته بالا بود. سلول‌های خون‌ساز مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی مقادیر کمی از مولکول‌های MHC I را بیان می‌کردند، لذا توسط سلول‌های کشنده طبیعی میزبان از بین می‌رفتند. حذف سلول‌های کشنده طبیعی توسط حذف آنتی‌بادی یا دست‌کاری ژنتیکی در سلول‌های بنیادی جنینی حاصل از همانندسازی درمانی زمینه تمایز آنها را به طور کارآمدی به دودمان‌های میلوییید و دودمان‌های لنفوییدی به میزان کمتری فراهم کرد. در نتیجه سلول‌های B و T فعال که آلل‌های گیرنده سلول T و ایمونوگلوبین آنها به خوبی بازآرایی شده بودند در موش پیوندی یافت شدند. اما از آنجا که HoxB4 تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های میلوییدی را پیش می‌برد، بازسازی لنفوییدی با به کارگیری فاکتور رونویسی دودمان لنفوییدی احتمالا موفق‌تر است. این آزمایش نشان داد که انتقال هسته و سلول‌های همراه با ژن درمانی را می‌توان برای درمان یک بیماری ژنتیکی نظیر بیماری‌های شناخته شده ژنتیکی نظیر کم خونی داسی شکل و تالاسمی به کار برد.

تولید کایمرای سلول‌های خون‌ساز (hematopoietic chimerism) روش دیگری برای جلوگیری از دفع پیوند است. بیماران بسیاری وجود دارند که به دنبال پیوند اندام نظیر کلیه، تحت انتقال مغز استخوان از همان فرد قرار می‌گیرند (۸۵، ۸۶). در این شرایط هیچ‌گونه داروی سرکوب کننده ایمنی نیاز نیست. زیرا لنفوسیت‌های گیرنده از فرد دهنده است و این سبب مقاومت ایمونولوژیک می‌شود. اما موفقیت در پیوند مغز استخوان یا سلول‌های بنیادی خون‌ساز، عموما نیازمند سرکوب کننده ایمنی سمی زیادی است. اخیرا روش‌هایی طراحی شده که دارای myelotoxic کمتری است و در ضمن اجازه پیوند سلول‌های بنیادی خون‌ساز را هم می‌دهد (۸۶). در این روش، مدت پیوند طولانی‌تر و بدون درمان سرکوب‌کننده ایمنی طولانی است. با استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی برای تولید سلول‌های بنیادی خون‌ساز و سایر دودمان‌ها، کایمرای خون‌ساز به وجود می‌آید. لذا به همراه پیوند سلول‌های قلبی مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های خون‌ساز ایجاد شده از همان سلول‌های بنیادی نیز به فرد بیمار انجام می‌شود. از آنجا که بخشی از مغز استخوان و سیستم ایمنی فرد بیمار از سلول‌های بنیادی جنینی ایجاد می‌شود، در نتیجه دفع پیوند نخواهیم داشت و نیاز به استفاده از داروهای سرکوب‌کننده ایمنی نیست. در نهایت مدل میمون رزوس برای ارزیابی تمام این روشها ضروری است.

نتیجه گیری

در مجموع سلول‌های بنیادی جنینی با پتانسیل تولید هر سلولی یا بافت دل‌خواه، دانش زیست شناسی تکوینی، داروشناسی و طب پیوند را متحول خواهد نمود. اما لازم به ذکر است تا کاربرد این سلول‌ها در درمان بیماریها راه زیادی در پیش است و قبل از آن باید بر بعضی مشکلات در نگهداری و کشت سلول‌های بنیادی و تمایز جهت‌دار آن‌ها غلبه کرد.

Refrences

1. Smith AG: Embryo-derived stem cells: of mice and men. Annu RevCell. Dev Biol 2001; 17, 435-462

2. Wagers AJ: Weissman IL Plasticity of adult stem cells.Cell. 2004; 116 (5):639-48

3. Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins, GR, Gearhart JD: Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. Proc Natl Acad Sci, 1998; 95: 13726-13731

4. Solter D, Skreb N, Damjanov,I. Extra uterine growth of mouse egg cylinders results in malignant teratoma. Nature,1970 227,503–4

5. Doyonnas R, LaBarge MA, Sacco A, Charlton C, Blau HM: Hematopoietic contribution to skeletal muscle regeneration by myelomonocytic precursors. Proc Natl Acad Sci. 2004; 101: 13507-13512

6. Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, Maisel M, Lerche H, Schwarz J, Brenner R, Storch A: Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. J Cell Sci. 2004; 117(Pt 19): 4411-4422

7. Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK: In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. Hepatol 2004; 40: 1275-1284

8. Evans MJ, Kaufman MH: Establishment in culture of pluripotential cellsfrom mouse embryos. Nature1981; 292: 154-156

9. Martin GR: Isolation of a pluripotent cell line from early

mouse embryoscultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cels. Proc. Natl Acad Sci, 1981; 78: 7634-7638

10. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998; 282: 1145-1147

11. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A: Embryonic stem cell lines from human blastocysts: Somatic differentiation invitro. Nat Biotechnol 2000; 18: 399-404

12. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM: Embryonic stem cell lines derived fromhuman blastocysts. Science 1998; 282: 1145-1147

13. Thomson JA, J Kalishman, Golos TG, Durning M, Harris CP, Hearn JP: Pluripotent cell lines derived from common marmoset (Callithrixjacchus). blastocysts. Biol Reprod 1996; 55: 254-259

14. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durming M, Harris CP, Becker RA,and Hearn JP: Isolation of a primate embryonic stem cell line. Proc Natl Acad Sci 1995; 92: 7844-7848

15. Baharvand H, Matthaei KI: Culture Condition Difference for establishment of new embryonic stem cell lines from the C57BL/6 and BALB/c mouse strains. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2004; 40: 76-81

16. Hong Y, C Winkler, Schartl M: Production of medakafish chimerasfrom a stable embryonic stem cell line. Proc Natl Acad Sci 1998; 95: 3679-3684

17. Sun L, CS Bradford, G Ghosh, P Collodi: ES- like cell cultures derivedfrom early zebrafish embryos. Mol Mar Biol Biotechnol 1995; 4: 193-199

18. Pain B, P Chenevier, J Samarut: Chicken ES cells and transgenicstrategies. Cells Tissues Organs 1999; 165: 212-219

19. Change IK, DL Jeong, YH Hong, TS Park, YK Moon, T Ohon, JY Han: Production of germ line chimeric chickens by transfer of culturedprimordial germ cells. Cell Biol Int 1997; 21: 495-499

20. Schoonjans L, GM Albricht, JL Li, D Collen, RW Moreadith: Pluripotential rabbit embryonic stem (ES) cells are capable of forming overtcoat colour chimeras following injection into blastocysts. Mol Reproed Dev 1996; 45: 439-443

21. Moens A, B Flechon, J Degrouard, X Vignon, J Ding, JE Flechon, KJBetteridge, JP Renard: Ultrastructural and immunocytochemical analysisof diploid germ cells isolated from fetal rabbit gonads. Zygote 1997; 5: 47-60

22. Lannaccone PM, Gu Tabom, RL Garton, MD Caplice, RD Brenin: Pluripotent embryonic stemcells from the rat are capableofproduing chimeras. Dve Biol 1994; 163: 288-292

23. Doetschman T, CP Williams, N Maeda: Establishment of hamster blastocyst - derived embryonic stem (ES) cells. Dev Biol 1988; 127: 224-227

24. Sukoyan MA, AN Golubitsa, AI, Zhelezova AG, Shilov SY, Vatolin LP,Maximovsky, LE Andreeva, J McWhir, SD Pack, SI Baybordin, AY Kerkis, HIKizilova, OL Seov: Isolation and cultivation of blastocyst derived stemcell lines from American mink (Mustela vison) Mol Reprod Dev 1992; 33: 418-431

25. Wheeler MB: Development and validation of swine embryonic stemcells: A review: Reprod Fertil Dev 1994; 6: 563-568

26. Piedrahita JA, K Moore, B Octama, CK Lee, N Seales, J Ramsoondar, FWBaze, T Ott: Generation of transgenic porcine chimeras using primordialgerm cell-derived colonies. Biol Reprod 1998; 58: 1321-1329

27. Cibelli JB, SL Stice, PG Golueke, JJ Kane, J Jerry, ESC Blackwell, FA Poncede Leon, MJ Robl: Transgenic bovine chimeric offspring producedfrom somatic cell-derived stem-like cells. Nat Biotechnol 1998; 16: 642-646

28. Strelchenko N: Bovine pluripotent stem cells. Theriogenol 1996; 45: 131-140

29. Wells DN, PM Misica, TAM Day, HR Tervit: Production of clonedlambs from an established embryonic cell line: A comparsion between in vivoand in vitro matured cytoplasts. Biol Reprod 1997; 57: 385-393

30. Baharvand H, Ashtiani SK, Valojerdi MR, Shahverdi A, Taee A, Sabour D: Establishment and in vitro differentiation of a new embryonic stem cell line from human blastocyst. Different 2004; 72: 224-229

31. Odorico, JS; Kaufman, DS;Thomson, JA.Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. Stem Cells, 2001 19, 193-204

32. Kirschstein R, Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions, NIH, 2001; http://stemcells.nih.gov/info/scireport

33. Baharvand H, Ashtiani SK, Taee A, Massumi M, Valojerdi MR, Eftekhari P, Moradi Sh: Z. Generation of New Human Embryonic Stem Cell Lines with Diploid and Triploid Karyotypes. Development, Growth and

Differentiation (2005 2005, IN PRESS)
34. The National Institute of Health resource for Stem Cell Reseaerch: http//stemcells.nih.gov/info/scireport
35. Tomida M, Yamamoto Yamaguchi Y, Hozumi M: Purification of afactor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic M1 cells fromconditioned medium of mouse fibroblast L929 cells.J Biol Chem 1984; 259: 10978-10982
36. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D: Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. Nature 1988; 336: 688-690
37. Nichols J, Evans EP, Smith AG: Establishment of germ- linecompetent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity.Development 1990; 110: 1341-1348
38. Razz R, Lee CK, Cannizzaro LA, d'Eustachio P, Levy DE: Essential role of STAT3 for embyronic stem cell pluripotency. Prco Natl Acad Sci 1999; 96: 2846-2851
39. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, ChambersL, Scholer H, Smith A: Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct-4. Cell 1998; 95: 379-391
40. Niwa H, Miyazaki JI, Smith AG: Quantitative expression ofOct3/-4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells.Nat. Genet 2000; 24: 372-376
41. Pease M, Wang X, Wolgemuth DJ, Scoler H: Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. Mech. Dev1998; 71: 89-98
42. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R: Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. Genes Dev. 2003 ;17: 126-140
43. Hanna LA, Foreman RK, Tarasenko IA, Kessler DS, Labosky PA: Requirement for Foxd3 in maintaining pluripotent cells of the early mouse embryo. Genes Dev 2002; 16: 2650-2661
44. Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A: Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. Genes &Dev 1998; 12: 2048-2060
45. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, Abbondanzo SJ: Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. Nature 1992, 359: 76-79
46. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A: Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. Cell 2003; 113: 643-655
47. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S: The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. Cell 2003; 113: 631-642
48. Marshak DR, Gottlieb D, Kiger AA, Fuller MT, Kunath T, Hogan B: Stem cell biology,Marshak DR, GarnderRL, and Gottlieb D. eds (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring HarborLaboratory Press 2001)
49. Cavaleri F, Scholer HR: Nanog: a new recruit to the embryonic stem cell orchestra. Cell 2003; 30; 113(5): 551-552
50. Shamblott MJ, Axelman J, Littlefield JW: Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. Proc Natl Acad Sci, 2001; 98: 113-118
51. Baharvand H, Azarnia M, Parivar K, Ashtiani SK: The effect of extra cellular matrix on embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol, 2005; 38: 495-503
52. Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, Wood J, Strauss JF 3rd, Boiani M, Scholer HR: Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells Science. 2003; 300: 1251-1256
53. Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, Noce T: Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. Proc Natl Acad Sci 2003; 100: 11457-11462
54. Baharvand H, Power JM, Ozsarac N, Matthaei KI: Differentiation of embryonic stem cells into functional neurons in vitro. Neuroscience Research Communications 2004, 35: 130-138
55. Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K, Nishikawa S: Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. Nature 2000; 408: 92-66
56. Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD: Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. Nat Biotechnol. 2000; 18: 675-679

57. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R: Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. Science. 2001; 292: 1389-1394

58. Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM: Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. Cell 2002; 110: 385-397

59. Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sanchez-Pernaute R, Bankiewicz K, McKay R: Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. Nature. 2002; 418: 50-56

60. Soria B, Roche E, Berna G: Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. Diabetes 2000; 49: 157-162

61. Kyba M, Perlingeiro RC, Daley GQ: HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. Cell 2002; 109: 29-37

62. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA: Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. Stem Cells. 2001; 19: 193-204

63. Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J: Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci 2000; 97: 11307-11312

64. Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY: Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. J Clin Invest 1996; 98: 216-224

65. Li M, Pevny L, Lovell-Badge R: Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. Curr Biol 1998; 8: 971-974

66. Pasumarthi KBS, Field LJ: Cardiomyocyte Enrichment in Differentiating ES Cell Cultures: Strategies and Applications. Methods in Molecular Biology 2002,Vol. 185: Embryonic Stem Cells: Methods and Protocols Edited: K. Turksen , Humana Presss Inc Totowa NJ, PP 157-168

67. Bain G, Kitchens D, Yao M: Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. Dev Biol 1995; 168: 342-357

68. Wobus AM, Wallukat G, Hescheler J: Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomycocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca2+ channel blockers. Differentiation 1991; 48: 173-182

69. Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC: Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. Mech Dev 1996; 59: 89-102

70. Burns RS, Chiueh CC, Markey SP: A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Proc Natl Acad Sci 1983; 80: 4546-4550

71. Jones CW, Reynolds WA, Hoganson GE: Streptozotocin diabetes in the monkey: plasma levels of glucose, insulin, glucagon, and somatostatin, with corresponding morphometric analysis of islet endocrine cells. Diabetes 1980; 29: 536-546

72. McDonald JW, Liu XZ, Qu Y: Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. Nat Med 1999; 5: 1410-1412

73. Brustle O, Spiro AC, Karram K: In vitro-generated neural precursors participate in mammalian brain development. Proc Natl Acad Sci 1997; 94: 14809-14814

74. Kaufman DS, Odorico JS, Thomson JC: Transplantation therapies from human embryonic stem cells-circumventing immune rejection. e-biomed 2000; 1: 11-15

75. Grusby MJ, Auchincloss H Jr, Lee R: Mice lacking major histocompatibility complex class I and class II molecules. Proc Natl Acad Sci 1993; 90: 3913-3917

76. Westphal CH, Leder P: Transposon-generated 'knock-out' and 'knock-in' gene-targeting constructs for use in mice. Curr Biol 1997; 7: 530-533

77. Hardy RR, Malissen B: Lymphocyte development. The (knock) ins and outs of lymphoid development [Editorial]. Curr Opin Immunol 1998; 10: 155-157

78. Harlan DM, Kirk AD: The future of organ and tissue transplantation: can T-cell costimulatory pathway modifiers revolutionize the prevention of graft rejection? JAMA 1999; 282: 1076-1082

79. Walker PR, Saas P, Dietrich PY: Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: the tumor cell strikes back. J Immunol 1997; 158: 4521-4524

80. Silvers WK, Bartlett ST, Chen HD: Major histocompatibility complex restriction and transplantation immunity. A possible solution to the allograft problem.

Transplan 1984; 37:28-32
81. Biscoe DM, Dharnidharka VR, Isaacs C: The allogeneic response to cultured human skin equivalent in the hu-PBL-SCID mouse model of skin rejection. Transplantation 1999; 67: 1590-1599
82. Hochedlinger K, Jaenisch R: Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. N Engl J Med. 2003; 349: 275-286
83. First NL, Thomson J: From cow's stem therapies? Nat Biotechnol 1998; 16: 620-621
84. Hwang WS, Ryu YJ, Park JH, Park ES, Lee EG, Koo JM, Jeon HY, Lee BC, Kang SK, Kim SJ, Ahn C, Hwang JH, Park KY, Cibelli JB, Moon SY: Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. Science. 2004; 303: 1669-1674
85. Butcher JA, Hariharan S, Adams MB: Renal transplantation for end-stage renal disease following bone marrow transplantation: a report of six cases, with and without immunosuppression. Clin Transplant 1999; 13: 330-335
86. Spitzer TR, Delmonico F, Tolkoff-Rubin N: Combined histocompatibility leukocyte antigen-matched donor bone marrow and renal transplantation for multiple myeloma with end stage renal disease: the induction of allograft tolerance through mixed lymphohematopoietic chimerism. Transplantation 1999; 68: 480-484
87. Hochedlinger K, Jaenisch R: Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. N Engl J Med, 2003; 349: 275-286